

肥厚性瘢痕におけるマトリックス関連酵素, 特にコラーゲナーゼの遺伝子発現の解析

森 康 二

肥厚性瘢痕病変部の病理組織学的特徴は線維化であり, 真皮に過剰なコラーゲンの沈着を認める. 本研究の目的は, ヒト肥厚性瘢痕由来真皮線維芽細胞におけるコラーゲン発現の増加およびその特異的分解酵素であるコラーゲナーゼ発現の減少の有無を検討することである. 著者は肥厚性瘢痕の中心部, 辺縁部, 病変外部より採取し初代培養した真皮線維芽細胞の $\alpha_1(I)$ 及び $\alpha_1(III)$ コラーゲン, コラーゲナーゼ, TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase) のメッセンジャー RNA (mRNA) の発現量を正常皮膚由来線維芽細胞のそれを対照として比較検討した. $\alpha_1(I)$, $\alpha_1(III)$ コラーゲン mRNA の量は病変の辺縁部, 病変外部由来線維芽細胞で増加し, 中心部では対照と差を認めなかった. 一方コラーゲナーゼ mRNA の量は肥厚性瘢痕線維芽細胞では全体的に減少しており, その割合は中心部 (対照の25%) > 辺縁部 (同43%) > 病変外部 (同84%) の順に著明であった. コラーゲナーゼ mRNA 量の結果は, コラーゲナーゼ活性量 (FITC でラベルした I 型コラーゲンの分解率で測定したコラーゲナーゼ活性) とよく相関していた. 以上の結果は肥厚性瘢痕由来線維芽細胞におけるコラーゲナーゼ遺伝子発現の減少がその病変部における, 過剰なコラーゲンの沈着を引き起こしている原因の一つであることを示唆している. (平成7年8月12日採用)

Analysis of Collagenase Gene Expression by Cultured Fibroblasts in Hypertrophic Scars

Yasuji MORI

Hypertrophic scars can form as a result of deep dermal injury, such as extensive thermal injury, and are characterized by excessive collagen deposition. The purpose of this study was to determine if there is not only increased expression of collagen but also decreased expression of collagenase in hypertrophic scar fibroblasts. We compared the expression of mRNA for $\alpha_1(I)$ and $\alpha_1(III)$ collagen, and collagenase in cultured fibroblasts from different portions of hypertrophic scars and normal dermis. In hypertrophic scar fibroblasts, increased levels of $\alpha_1(I)$ and $\alpha_1(III)$ collagen mRNAs were observed in fibroblasts from the edge and outside of scar tissue, while normal levels were noted in fibroblasts from the center of this tissue. In contrast, decreased levels of collagenase mRNA were found in the hypertrophic scar fibroblasts. The rates of these decreases were ; center (25% of the control) > edge (43% of the control) > outside (84% of the control). The changes in the

collagenase mRNA levels of the hypertrophic scar fibroblasts correlated well with decreased collagenolytic activity as determined by the degradation rate of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled type I collagen in fibroblast culture supernatant. These results suggest that decreased expression of collagenase in hypertrophic scar fibroblasts may be one possible cause of the excessive accumulation of collagen in the skin lesions of hypertrophic scars. (Accepted on August 12, 1995) *Kawasaki Igakkaishi*

21(2): 89-98, 1995

Key Words ① Hypertrophic scars ② Fibroblasts ③ Collagenase
④ Gene expression ⑤ Metalloproteinase

緒 言

肥厚性瘢痕は熱傷等の深い真皮の損傷によって引き起こされるが、その特徴は真皮におけるコラーゲンの過剰な蓄積である。ケロイドはそれに関連した病態として知られ、真皮にコラーゲンを中心とした細胞外マトリックスが、より顕著に沈着している疾患である。線維芽細胞は真皮やその他の器官の結合組織において、細胞外マトリックスの代謝を担う主要な細胞の一つである。通常の状態では、コラーゲンなどの細胞外マトリックス成分のみならずその分解酵素も産生する。一方、細胞外マトリックス成分の合成と分解のバランスは、創傷治癒に見られる生理的修復反応の過程で一過性に変動することが知られており、このバランスの異常が肥厚性瘢痕やその他の疾患で起こる線維化に極めて重要であると考えられている^{2)~4)}。これらのマトリックス成分はコラゲナーゼなどのマトリックス関連分解酵素ファミリーによって分解される。そして、これらの分解酵素はTIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase) などによって調節を受けている^{5)~8)}。このように肥厚性瘢痕の病変形成にはマトリックス成分分解系の関与が強く示唆され、その動態は非常に興味深い。これまでに、ケロイド、肥厚性瘢痕由来線維芽細胞においてコラーゲン遺伝子の発現は増加するという報告がなされているが^{9)~11)}、一方、マトリックス分解酵素あるいはその抑制因子の発現についての研究は十分行われていない。肥厚性瘢

痕は病理組織学的にその中心部においてはコラーゲン線維が増加しており、辺縁部では血管周囲性リンパ球細胞浸潤もその特徴となっている¹²⁾。本研究において著者は、肥厚性瘢痕組織を中心部、辺縁部、病変外部に分け、それぞれの部位由来の線維芽細胞における細胞外マトリックス、特にコラーゲンの産生及びその分解系の変動について、コラーゲン及びマトリックス関連酵素の遺伝子発現量を測定することにより検討を行った。

材 料 と 方 法

1. 生検組織、線維芽細胞の培養

肥厚性瘢痕組織は、9歳から27歳の5人の患者から採取し、対照には健常皮膚を使用した。詳細をTable 1に示した。標本は2分し、一方は-80°Cに保存した。他方を中心部、辺縁部、病変外部の3つの部位に分け、文献¹³⁾の方法に従い outgrowth 法によって20% fetal bovine serum (FBS), glutamine (0.6 mg/ml), penicillin (100 U/ml), streptomycin (50 µg/ml) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を使用して初代培養を行った。切除部分からの outgrowth を確認した後、初代培養を trypsinization (0.2% trypsin, 0.7 mM ethylenediamine tetraacetic acid) を行い、25 cm² プラスチックフラスコ内で継代培養した。培養液は10% FBS 加 DMEM を使用し、3日毎に交換した。さらに、継代は分割比1:2で行った。実験には継代数3~5のものを使用した。

Table 1. Source of hypertrophic scar fibroblasts and normal control fibroblasts

細胞株	性	年齢	継代数	部位	病理学的部位	経過
肥厚性瘢痕						
S27FC	F	27	4	上腕	Center	2年
S17FC	F	17	3	顔面	Center	11ヵ月
S17FE 1			3		Edge	
S17FE 2			4		Edge	
S17FO			3		Outside	
S12FC	F	12	5	大腿	Center	1年
S12FE			4		Edge	
S12FO			5		Outside	
S11FC	F	11	3	大腿	Center	4年
S11FE			3		Edge	
S11FO			3		Outside	
S9FC	F	9	3	臀部	Center	3年
正常						
N16M	M	16	3	顔面		
N18F	F	18	4	前腕		
N20F	F	20	3	下腿		

2. RNAの抽出及び mRNA 量の測定

得られた線維芽細胞は150×10 mm ディッシュに10% FBS 加 DMEM で培養, コンフルエントに達したものを使用した. 培養液を除去し, 細胞を冷却した phosphate-buffered saline (PBS) で2回洗浄後, 0.75%メルカプトエタノールを含む5 M Guanidine thiocyanate (GTC) を加え, ラバーポリスマンを用い細胞層の extract を得た. extract を5.7 M 塩化セシウム (CsCl) に重層し, total RNA を超遠心分離した¹⁴⁾. mRNA の測定は Northern blot 法により行った. 文献^{15), 16)}に従い, 各レーン5 µg の RNA を0.8% Agarose/formaldehydeゲルで電気泳動し, それを, ニトロセルロース紙に転写した. これを bake, prehybridization したのち, 42°C で一晩, ³²P でラベルした特異的 cDNA プローブと hybridization した. なお, 使用した cDNA プローブについては項目³⁾で述べる. フィルターは2×SSC, 0.1% SDS 及び, 0.1×SSC, 0.1% SDS で洗浄し, 乾燥後 Bioimaging analyzer Fuji×BAS 2000 (Fuji, Japan) によってスキャンし放射線活性を densitometrical に測定することにより解析を行っ

た.

3. cDNA プローブ

ヒト由来特異的 cDNA プローブとして, α_1 (I) コラーゲンは1.5-Kb の insert を持つ plasmids Hf677¹⁷⁾, α_1 (III) コラーゲンは0.9-Kb の insert を持つ plasmids p III-33¹⁸⁾, コラゲナーゼは0.7-Kb の insert を持つ plasmidn K4¹⁹⁾, TIMP は0.7-Kb の insert を持つ plasmids pTrpCl-9²⁰⁾, β -actin は0.5-Kb の insert を持つ plasmids pHFA-1²¹⁾ をそれぞれ使用した. また, それぞれの cDNA プローブは, 同じフィルターを rehybridization することにより発現を対比した.

4. コラゲナーゼ活性の測定

コラゲナーゼ活性の測定は, 文献²²⁾に従った. 線維芽細胞を six-well multiple dishes にまき, 10% FBS を含む DMEM でまず培養した. コンフルエントとなった線維芽細胞の細胞層を PBS ですすいだのち, 血清を含まない DMEM を加えて37°C で48時間培養を継続. 培養液を除去した後, 0.05M Tris-HCl (pH 7.5) および0.01M CaCl₂ を加えた状態で-80°C に保存. コラゲナーゼ活性は, fluorescein isothiocyanate (FITC) でラベルした I 型コラーゲンを substrate とした solution 法で測定した^{23)~25)}. 1 µg のコラーゲンを1分間に分解するコラゲナーゼの量を1ユニット (U) と定義した.

5. In situ hybridization 法²⁶⁾

-80°C に保存した組織片を, クリオスタットを用いて厚さ5 µm とし, 5%パラホルムアルデヒド加磷酸緩衝液にて固定. prehybridization を行った後, ³⁵S でラベルした特異的 mRNA プローブを組織に重層し, 50°C にて8時間 hybridization. 余分なプローブを2×SSH/50% formamide で2回, 2×SSC で5回洗浄したのち, エタノールで脱水. 乳剤を重層した状態で

ブラックボックスに収納し、4°C に保存。3 週後に現像したものを Hematoxylin-Eosin にて染色し観察した。ヒト由来特異的 mRNA プローブは sense, antisense 共に、別項で述べた cDNA をもとに作製し使用した。

結 果

$\alpha_1(I)$, $\alpha_1(III)$ コラーゲン, コラゲナーゼ, TIMP の正常及び肥厚性瘢痕由来線維芽細胞における mRNA レベルを, Northern blotting で, **Figure 1A, B, C** に示した。各放射能活性は Bioimaging analyzer Fujix BAS 2000 (Fuji, Japan) によって densitometrical に測定し, 正常線維芽細胞と対比した (**Table 2**)。3 つの正常線維芽細胞株はコラーゲン, コラゲナーゼ,

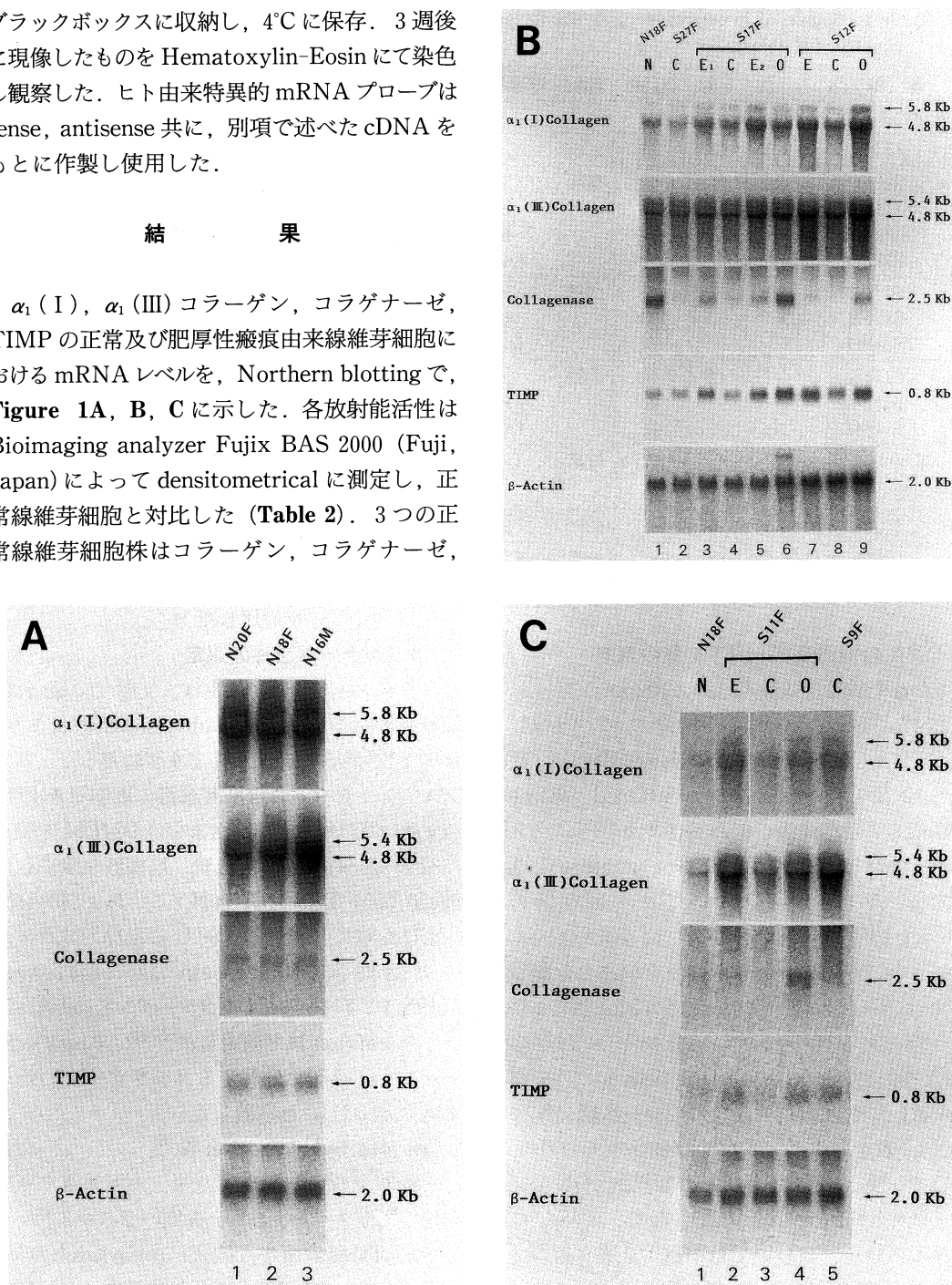


Fig. 1. Northern blot analysis of $\alpha_1(I)$ collagen, $\alpha_1(III)$ collagen, collagenase, TIMP and β -actin mRNA in cultured normal and hypertrophic scar fibroblasts. Total RNA obtained from normal (A, lane 1, 2 and 3., B. lane 1., C. lane 1) and hypertrophic scar (B. from lane 2 to lane 9, C. from lane 2 to lane 5) fibroblasts were electrophoresed and transferred to nitrocellulose, and mRNAs were hybridized to labeled cDNA probes. N: normal, C: center of scar tissue, E: edge of scar tissue, O: outside of scar tissue.

Table 2. mRNA levels of α_1 (I) collagen, α_1 (III) collagen, collagenase and TIMP in hypertrophic scar fibroblasts

細胞	α_1 (I) Collagen	α_1 (III) Collagen	Collagenase	TIMP
control	100	100	100	100
中心部				
HS27FC	115	115	21	90
HS17FC	96	89	26	89
HS12FC	79	93	9	86
HS11FC	121	124	23	85
HS 9 FC	205	223	46	99
mean \pm SD	123.2 \pm 43.49	128.8 \pm 48.89	25 \pm 10.94	89.8 \pm 4.96
辺縁部				
HS17FE ₁	136	120	42	131
HS17FE ₂	150	149	43	119
HS12FE	148	129	30	114
HS11FE	276	263	58	116
mean \pm SD	177.5 \pm 57.12	165.25 \pm 57.4	43.25 \pm 9.93	120 \pm 6.6
病変外部				
HS17FO	106	105	72	125
HS12FO	157	130	62	119
HS11FO	203	203	117	112
mean \pm SD	155.3 \pm 39.62	146 \pm 41.58	83.7 \pm 23.92	118.7 \pm 5.31

The intensities of the mRNA bands on the Northern blot were scanned densitometrically. The quantity of each mRNA level was normalized for the quantity of β -actin mRNA, and the expression levels of each mRNA/ β -actin mRNA in the hypertrophic scar fibroblasts were compared to those in normal fibroblasts, which were set arbitrarily to 100.

TIMP, β -アクチンなどどれもほぼ同じ level であった (Fig. 1A). 肥厚性瘢痕線維芽細胞ではまず, α_1 (I), α_1 (III) コラーゲン mRNA は辺縁部, 病変外部において正常より増加する傾向を示したのに対し, 中心部では正常と同程度であった (Fig. 1B, C, Table 2). 一方, コラゲナーゼ mRNA は肥厚性瘢痕全体で発現が減少しており, その割合は中心部 (正常の25%, $p < 0.01$, student t-test) > 辺縁部 (同43%, $p < 0.01$, student t-test) > 病変外部 (同84%) の順に著名であった (Fig. 1B, C, Table 2). TIMP mRNA は辺縁部, 病変外部で軽度増加傾向にあったが, 中心部では逆に減少傾向を示した (Fig. 1B, C, Table 2). コラゲナーゼ活性の結果を Figure 2 に示した. 正常のコラーゲン分解活性は $0.62 \pm 0.11/10^6$ cells であった. それに対し, 肥厚性瘢痕では辺縁部と中心部におい

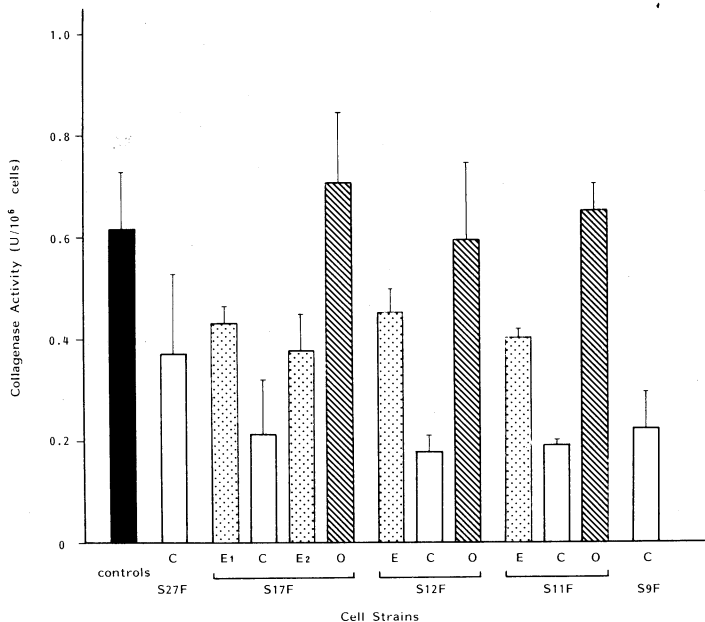


Fig. 2. Collagenase activity in dermal fibroblasts derived from patients with hypertrophic scars and normal individuals. Collagenase activity in the cultured medium was measured with an FITC-labeled bovine type I collagen substrate. The values are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of the unit (U) per 10^6 cells. C: center of scar tissue, E: edge of scar tissue, O: outside of scar tissue.

てその活性の低下が認められた。低下率は中心部(正常の38%, $p < 0.01$, student t-test) > 辺縁部(同66%, $p < 0.01$, student t-test)であった。

In situ hybridization による組織内線維芽細胞の検討でも、培養線維芽細胞とほぼ同様の結果が認められた。その内、最も顕著な差の見られたコラゲナーゼ標本を **Figure 3A, B, C** に示した。**Figure 3A** は明視野において辺縁部(上)と中心部(下)を対比したもので、辺縁部(上)においては上に顆粒を集簇した細胞(↑)が多数見られるのに対し、中心部(下)では明らかに減少している。**Figure 3B** は **Figure 3A** を暗視野で見たものであり、その差がさらに顕著に分かる。**Figure 3C** は **Figure 3A** (上)をさらに拡大したもので、顆粒を集簇した細胞の状態が鮮明である。なおコントロールとして用

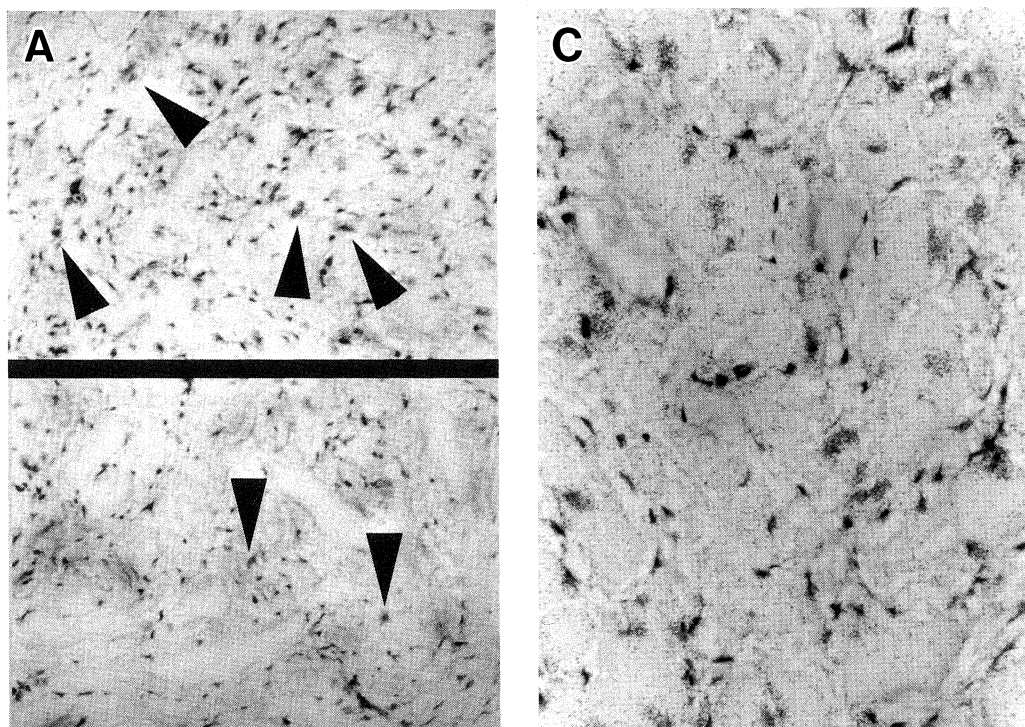


Fig. 3. In situ hybridization of edge (upper) and center (lower) of hypertrophic scar tissue with the collagenase antisense probe. **A**: bright field ($\times 100$). **B**: dark field ($\times 100$). **C**: high magnification (bright field, $\times 200$). Labelling of fibroblasts (↑) in the dermis with the collagenase antisense RNA probe.

いた sense RNA プローブによる物では、バックグラウンドの顆粒のみで特異的な顆粒は認められなかった。

考 察

ケロイド及び肥厚性瘢痕組織由来線維芽細胞はコラーゲンの過剰産生及びコラーゲン mRNA の過剰発現が報告されている^{9)~11)}。その中で Ghahary ら¹¹⁾ は、6 例の熱傷後肥厚性瘢痕由来線維芽細胞の α_1 (I) コラーゲン mRNA の発現レベルを正常のものと比較したところ、その発現レベルにはかなりの量的な多様性があったと報告している。今回の研究で、著者もまたかなりの多様性を α_1 (I) 及び α_1 (III) コラーゲンの発現において観察した。I 型及び III 型コラーゲン mRNA レベルは、瘢痕組織の辺縁部及び病変外部由来の線維芽細胞でのみ増加しており、このことはコラーゲンの産生が瘢痕組織の中心よりは、むしろ周辺部の線維芽細胞で高いことを示唆している。このように今回の研究においても肥厚性瘢痕由来線維芽細胞の全株ではなかったが、いくつかの株においてコラーゲン遺伝子発現の増加が示され、このことは既報^{9)~11)}の結果にほぼ一致するものであったといえる。

肥厚性瘢痕組織由来線維芽細胞は、コラーゲン及びその他の細胞外マトリックス成分の多量の蓄積に加えて、コラゲナーゼ等のマトリックス関連分解酵素の発現を抑制することによって細胞外マトリックス成分の形成を促進させていると考えられる。本研究において肥厚性瘢痕組織由来線維芽細胞におけるコラゲナーゼ遺伝子発現が低下しており、その中心部由来の線維芽細胞では著しく低下していることが明らかにされた。この結果は Varedi ら²⁷⁾が正常と肥厚性瘢痕由来線維芽細胞のコラゲナーゼ mRNA 発現量が同じであるとする結果とは矛盾するものである。しかし、この報告では瘢痕全体の値を示しており、今回の結果あるいは以前の報告²⁸⁾で示唆された、部位による発現量の多様性があるとするものとは条件が異なる。一方 TIMP-

mRNA の発現は肥厚性瘢痕組織由来線維芽細胞においてわずかな変化が見られるのみであった。その中心部由来の線維芽細胞では軽度の低下が、辺縁部及び病変外部由来の線維芽細胞では、軽度の上昇が認められた。最近、放射線照射による線維化部由来ブタ線維芽細胞において、コラゲナーゼ mRNA レベルが著しく低下し、TIMP mRNA レベルは逆に上昇することが報告されている²⁹⁾。これらのことより線維化組織中の線維芽細胞におけるコラゲナーゼの発現は一般的に低下するが、TIMP の発現は様々な因子により多様性を示すことが想像される。

いくつかのサイトカイン^{30)~32)}、成長因子^{33)~35)}、ある種の化学物質³⁶⁾等は、コラーゲンとコラゲナーゼ間で遺伝子発現の逆方向への調節を示すことが知られている。例えば TGF β_1 は I 型コラーゲン発現を上昇させ、コラゲナーゼ発現を低下させる³⁵⁾。最近 I 型及び III 型コラーゲンと TGF β_1 発現が平行して上昇する現象が肥厚性瘢痕組織中で認められ、本疾患でもコラーゲン代謝の調節に局所で産生された TGF β_1 が重要な働きをすることを示唆するとの報告がなされた^{37),38)}。本研究において肥厚性瘢痕組織の周辺部由来線維芽細胞で、コラーゲン産生の上昇とコラゲナーゼ産生低下が認められ、TGF β ファミリーによる影響が示唆される。しかし、瘢痕組織の中心部由来の線維芽細胞において著明なコラゲナーゼ mRNA 発現の減少と I 及び III 型コラーゲン mRNA が正常レベルであることが観察された。これには以下に述べる 2 つの理由が考えられる。1 つは瘢痕組織の中心部由来の線維芽細胞ではなんらかの機序により TGF β のコラゲナーゼ発現抑制効果のみが存続しているとする見方。もう 1 つは、例えばコルチコステロイド^{39),40)}のような線維芽細胞のコラゲナーゼ産生抑制効果を示す因子が瘢痕組織の中心部由来の線維芽細胞により強く影響をもたらしているとする説明である。

本研究で著者が明らかにした最も重要な所見は肥厚性瘢痕由来の線維芽細胞でコラゲナーゼ遺伝子発現が減少することである。このことか

ら肥厚性瘢痕組織においてコラーゲンの過剰沈着を来す1つの要因として、コラゲナーゼ発現減少の関与が考えられる。また、今回の実験におけるコラゲナーゼ発現の低下は少なくともmRNAの段階までに調節されていることを明らかにした。しかし、多くの条件で線維芽細胞のコラゲナーゼ産生は転写段階で調節されていることが知られている。例えば線維芽細胞をTPA³⁶⁾、腫瘍壊死因子 α (TNF α)⁴¹⁾、グルココルチコイド⁴²⁾等で反応させたとき、また、病的状態すなわち劣性栄養障害性先天性表皮水疱症⁴³⁾、先天性皮膚弛緩症⁴⁴⁾の真皮由来線維芽細胞でコラゲナーゼの転写段階での調節に異常があることが知られている。そしてこれらの病的状態あるいは条件において、TPA反応成分に対するDNA結合因子のAP-1(癌遺伝子産物JunのhomodimerあるいはJun/Fosのheterodimerよりなる転写活性因子)の活性化を変化

させることにより転写の調節がなされている。今後、肥厚性瘢痕由来線維芽細胞におけるコラゲナーゼ発現の転写レベルでの測定ならびに解析を行うことは本疾患の線維化における病態生理の解明と治療面への応用を検討するうえで極めて重要であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました川崎医科大学 皮膚科学教室 植木宏明教授に深謝いたします。また、直接ご指導を賜りました同教室 簗持淳講師に心から謝意を表します。また、御協力いただきました同教室 荒川雅美、武田孝爾、森 健一、吉田陽子、磯崎友実加の諸氏及び本学形成外科教室の諸先生方に感謝いたします。なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費(No6-602)の援助によって行われたものである。

文 献

- 1) Pinnell SR: Regulation of collagen synthesis. *J Invest Dermatol* 79 (Suppl. I): 73s-6s, 1982
- 2) Craig RD, Schofield JD, Jackson DS: Collagen biosynthesis in normal and hypertrophic scars and keloids as a function of the duration of the scar. *Br J Surg* 62: 741-744, 1975
- 3) Murray JC, Pollack SV, Pinnell SR: Keloids: A review. *J Am Acad Dermatol* 4: 461-470, 1981
- 4) Stricklin GP, Li L, Nanney LB: Localization of mRNAs representing interstitial collagenase, 72-kDa gelatinase, and TIMP in healing porcine burn wounds. *J Invest Dermatol* 103: 352-358, 1994
- 5) Matrisian LM: The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14: 455-463, 1992
- 6) Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA: Matrix metalloproteinases: A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197-250, 1993
- 7) Stricklin GP, Welgus HG: Human skin fibroblast collagenase inhibitor: Purification and biochemical characterization. *J Biol Chem* 258: 12252-12258, 1983
- 8) Welgus HG, Stricklin GP: Human skin fibroblast collagenase inhibitor: Comparative studies in human connective tissues, serum and amniotic fluid. *J Biol Chem* 258: 12259-12264, 1983
- 9) Cohen IK, Keiser HR, Sjoerdsma A: Collagen synthesis in human keloid and hypertrophic scar. *Surg Forum* 22: 488-489, 1971
- 10) Uitto J, Perejda AJ, Abergel RP, Chu ML, Ramirez F: Altered steady state ratio of type I/III procollagen mRNAs correlates with selectively increased type I procollagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5935-5939, 1985
- 11) Chahary A, Scott PG, Milhotra S, Friedland AU, Harrop AR, Forsyth NL, Tredget EE: Differential expression of type I and Type III procollagen mRNA in human hypertrophic burn fibroblasts. *Biomed Lett* 47: 169-184, 1992
- 12) Ackerman AB: Histologic diagnosis of inflammatory skin disease. LEA & FEBIGER, Philadelphia

phia, 1978, pp727—731

- 13) Arakawa M, Hatamochi A, Takeda K, Ueki H : Increased collagen synthesis accompanying elevated m-RNA levels in cultured Werner's syndrome fibroblasts. *J Invest Dermatol* : 187—190, 1990
- 14) Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 : 5294—5299, 1979
- 15) Thomas PS : Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 5201—5205, 1980
- 16) Hatamochi A, Aumailley M, Mauch C, Chu ML, Timpl R, Krieg T : Regulation of collagen VI expression in fibroblasts. Effects of cell density, cell-matrix interactions and chemical transformation. *J Biol Chem* 264 : 3494—3499, 1989
- 17) Chu ML, Myers JC, Bernard MP, Ding JF, Ramirez F : Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro $\alpha_1(I)$ collagen chain. *Nucleic Acid Res* 10 : 5925—5934, 1982
- 18) Miskulin M, Dalgleish R, Kluve-Beckerman B, Rennard SI, Tolstoshev P, Brantly M, Crystal RG : Human type III collagen genes expression is coordinately modulated with the type I collagen genes during fibroblast growth. *Biochemistry* 25 : 1408—1413, 1986
- 19) Angel P, Poting A, Mallick U, Rahmsdorf HJ, Schorpp M, Herrlich P : Induction of metalloproteinase and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol Cell Biol* 6 : 1760—1766, 1986
- 20) Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, Anderson DC, Smith CG, Welgus HG, Stricklin GP : Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 2407—2411, 1986
- 21) Gunning P, Ponte P, Okayama H, Engel J, Blau H, Kedes L : Isolation and characterization of full-length cDNA clones for human α -, β -, and γ -actin mRNA : Skeletal but not cytoplasmic actins have an amino-terminal cysteine that is subsequently removed. *Mol Cell Biol* 3 : 787—795, 1983
- 22) Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y : Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 103 : 359—363, 1994
- 23) Terato K, Nagai Y, Kawanishi K, Yamamoto S : A rapid assay method of collagenase activity using ^{14}C -labeled soluble collagen as substrate. *Biochim Biophys Acta* 445 : 753—762, 1976
- 24) Ohsawa S, Hori H, Hata R, Nagai Y : Stimulation of the collagen metabolism of articular chondrocytes in culture by a factor derived from polymorphonuclear leukocytes. *Biomed Res* 5 : 177—186, 1984
- 25) Hatamochi A, Wada T, Takeda K, Ueki H, Kawano S, Terada K, Morita T : Collagen metabolism in cutis laxa fibroblasts : increased collagenase gene expression associated with unaltered expression of type I and type III collagen. *J Invest Dermatol* 97 : 483—487, 1991
- 26) Oono T, Specks U, Eckes B, Majewski S, Hunzelman N, Timpl R, Krieg T : Expression of type VI collagen mRNA during wound healing. *J Invest Dermatol* 100 : 329—334, 1993
- 27) Varedi M, Tredget EE, Scott PG, Shen YJ, Ghahary A : Alteration in cell morphology triggers transforming growth factor- β_1 collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in normal and hypertrophic scar fibroblasts. *J Invest Dermatol* 104 : 118—123, 1995
- 28) Hembry RM, Ehrlich HP : Immunolocalization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in hypertrophic scar tissue. *Br J Dermatol* 115 : 409—420, 1986
- 29) Lafuma C, Nabout RAE, Crechet F, Hovnanian A, Martin M : Expression of 72-kDa gelatinase

- (MMP-2), collagenase (MMP-1), and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol* 102 : 945—950, 1994
- 30) Postlethwaite AE, Lachman LB, Mainardi CL, Kang AH : Interleukin 1 stimulation of collagenase production by cultured fibroblasts. *J Exp Med* 157 : 801—806, 1983
- 31) Scharffetter K, Heckmann M, Hatamochi A, Mauch C, Stein B, Riethmuller G, Ziegler-Heitbrock HWL, Krieg T : Synergistic effect of tumor necrosis factor- α and interferon- γ collagen synthesis of human skin fibroblasts in vitro. *Exp Cell Res* 181 : 409—419, 1989
- 32) Dayer JM, Beutler B, Cerami A : Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E_2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 162 : 2163—2168, 1985
- 33) Overall CM, Wrana JL, Sodek J : Induction of formative and resorptive cellular Phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF- β_1 and concanavalin A : Regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. *J Periodont Res* 26 : 279—282, 1991
- 34) Bauer EA, Cooper TW, Huang JS, Altman J, Deuel TF : Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 4132—4136, 1985
- 35) Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJP, Angel P, Heath JK : Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6 : 1899—1904, 1987
- 36) Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P : 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol* 7 : 2256—2266, 1987
- 37) Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Gong Y, Tredget EE : Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor- β , type I and type III procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues. *J Lab Clin Med* 122 : 465—473, 1993
- 38) Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget, EE : Expression of mRNA for transforming growth factor- β_1 is reduced in hypertrophic scar and normal dermal fibroblasts following serial passage in vitro. *J Invest Dermatol* 103 : 684—686, 1994
- 39) Medcalf, RL, Richards RI, Crawford RJ, Hamilton JA : Suppression of urokinase-type plasminogen activator mRNA levels in human fibrosarcoma cells and synovial fibroblasts by anti-inflammatory glucocorticoids. *EMBO J* 5 : 2217—2222, 1986
- 40) Frisch SM, Ruley HE : Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J Biol Chem* 262 : 16300—16304, 1987
- 41) Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M : Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- α . *Nature* 337 : 661—663, 1989
- 42) Jonat C, Rahmsdorf, HJ, Park KK, Cato ACB, Gebel S, Ponta H, Herrlich P : Antitumor promotion and antiinflammation : Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62 : 1189—1204, 1990
- 43) Unemori EN, Mauch C, Hoeffler W, Kim Y, Amento EP, Bauer EA : Constitutive activation of the collagenase promoter in recessive dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts : Role of Endogenously Activated AP-1. *Exp Cell Res* 211 : 212—218, 1994
- 44) Hatamochi A, Arakawa M, Mori K, Ueki H : Elevated collagenase mRNA levels in cutis laxa fibroblasts result from an increased transcription rate of the corresponding gene. (Abstr.) *J Dermatol Sci* 8 : 75, 1994